

# EUROPEAN PATENT OFFICE

## Patent Abstracts of Japan

PUBLICATION NUMBER : 2001178460  
PUBLICATION DATE : 03-07-01

APPLICATION DATE : 27-12-99  
APPLICATION NUMBER : 11371332

APPLICANT : FUJI PHOTO FILM CO LTD;

INVENTOR : SHINOKI HIROSHI;

INT.CL. : C12N 15/00 C12N 11/08 C12Q 1/68 G01N 33/53 G01N 33/547 G01N 33/566

TITLE : METHOD FOR IMMOBILIZING DNA FRAGMENT TO SURFACE OF SOLID-PHASE CARRIER AND DNA CHIP

ABSTRACT : PROBLEM TO BE SOLVED: To develop an immobilization method capable of bonding a DNA fragment separately prepared beforehand to the surface of a solid-phase carrier by a rapid reaction and making the reaction product stably maintain the bond and to obtain a DNA chip not especially requiring a blocking process.

SOLUTION: This method for immobilizing the DNA fragment to the surface of solid-phase carrier is characterized in that an aqueous liquid containing a DNA fragment containing an amino group at a terminal end is dotted and adhered to a solid-phase carrier supporting a polymer having a cyclic acid anhydride structure on the surface or a solid-phase carrier supporting a polymer comprising a carboxyl group-containing monomer as a constituent component on the surface is made into a cyclic acid anhydride by a dehydrating agent and the aqueous liquid containing the DNA fragment containing the amino group at the terminal end is dotted and adhered to the solid-phase carrier. This DNA fragment is obtained by the method. This method for detecting a nucleic acid fragment having complementarity to the DNA fragment on the DNA chip uses the DNA chip.

COPYRIGHT: (C)2001,JPO

4

1

2000

1

2000

2000

1

1

XP-002220951

AN - 2001-608990 [70]  
AP - JP19990371332 19991227  
CPY - FUJF  
DC - B04 D16 S03  
DR - 0843-S 0843-U  
FS - CPI;EPI  
IC - C12N11/08 ; C12N15/00 ; C12Q1/68 ; G01N33/53 ; G01N33/547 ; G01N33/566  
MC - B04-C03B B04-E01 B11-C08E4 B12-K04 D05-H09 D05-H10 D05-H12D1  
- S03-E14H4  
M1 - [01] F012 F015 F112 J5 J522 L9 ! 330 M280 M320 M413 M430 M510 M521 M530  
M540 M782 M904 M905 M910 P831 Q233; R00843-K R00843-Q R00843-M; 0843-S  
0843-U  
- [02] M430 M782 M905 P831 Q233; RA00NS-K RA00NS-M  
- [03] M750 M905; RA00NS-K RA00NS-A  
M6 - [04] M905 P831 Q233 R515 R521 R614 R625 R626 R639  
PA - (FUJF ) FUJI PHOTO FILM CO LTD  
PN - JP2001178460 A 20010703 DW200170 C12N15/00 010pp  
PR - JP19990371332 19991227  
XA - C2001-181253  
XIC - C12N-011/08 ; C12N-015/00 ; C12Q-001/68 ; G01N-033/53 ; G01N-033/547 ;  
G01N-033/566  
XP - N2001-454784  
AB - JP2001178460 NOVELTY - DNA chips without requiring blocking process,  
are new.  
- DETAILED DESCRIPTION - Immobilization of a DNA fragment on a solid  
carrier surface comprises spotting an aqueous liquid containing a DNA  
fragment having a terminal amino group on a solid phase carrier  
carrying a polymer having a cyclic acid anhydride structure on the  
surface, particularly prepared from maleic anhydride as a  
polymerization component, especially prepared by dehydration of a  
polymer composed of monomer having carboxyl group with a dehydrating  
agent, followed by heating at 80-180 deg. C. An INDEPENDENT CLAIMS is  
also included for resultant chip used for detection of a nucleic acid  
fragment complementary to the DNA fragment on the DNA chip comprising:  
- (i) addition of an aqueous solution containing fluorescent or  
radioactive substance labeled nucleic acid sample on the surface of  
the DNA chip;  
- (ii) hybridization of a nucleic acid fragment sample complementary to  
DNA fragment immobilized on DNA chip to immobilize on the DNA chip; and  
- (iii) detection of the fluorescent or radioactive labeled nucleic acid  
sample immobilized on the DNA chip, particularly electrochemical  
detection of current via a conductive group of an intercalator  
integrated in the hybrid structure formed of the DNA fragment of the  
DNA chip and the nucleic acid fragment sample.  
- USE - Detection of the DNA fragment.  
- ADVANTAGE - The invention provides sensitive detection of a sample  
nucleic acid fragment complementary to the DNA fragment on DNA chip.  
- (Dwg.0/0)

CN - R00843-K R00843-Q R00843-M RA00NS-K RA00NS-M RA00NS-A  
DRL - 0843-S 0843-U

\*\*\* DNA FRAGMENT SOLID CARRY SURFACE PREPARATION DNA CHIP BLOCK PROCESS

IKW - DNA FRAGMENT SOLID CARRY SURFACE PREPARATION DNA CHIP BLOCK PROCESS

NC - 001

OPD - 1999-12-27

ORD - 2001-07-03

PAW - (FUJF ) FUJI PHOTO FILM CO LTD

TI - Immobilization of a DNA fragment on a solid carrier surface for  
preparation of DNA chip without blocking processes

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号  
特開2001-178460  
(P2001-178460A)

(43) 公開日 平成13年7月3日 (2001.7.3)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テームコード* (参考)
C 1 2 N 15/00	Z N A	C 1 2 N 11/08	4 B 0 3 3
11/08		C 1 2 Q 1/68	Z 4 B 0 6 3
C 1 2 Q 1/68		G 0 1 N 33/53	M
G 0 1 N 33/53		33/547	
33/547		33/566	

審査請求 未請求 請求項の数 7 O L (全 10 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平11-371332	(71) 出願人	000005201 富士写真フイルム株式会社 神奈川県南足柄市中沼210番地
(22) 出願日	平成11年12月27日 (1999. 12. 27)	(72) 発明者	安達 慶一 神奈川県南足柄市中沼210番地 富士写真 フイルム株式会社内
		(72) 発明者	中村 剛希 神奈川県南足柄市中沼210番地 富士写真 フイルム株式会社内
		(74) 代理人	100074675 弁理士 柳川 泰男

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 固相担体表面へのDNA断片の固定方法及びDNAチップ

(57) 【要約】

【課題】 固相担体表面に、予め別に調製したDNA断片を迅速な反応によって結合させることが可能で、かつ、反応生成物が安定に結合を維持することが可能な固定方法を開発し、ブロッッキング工程を特に必要としないDNAチップを得ること。

【解決手段】 環状の酸無水物構造を持つポリマーを表面に担持した固相担体上に、末端部にアミノ基を有するDNA断片を含有する水性液体を点着すること、あるいはカルボキシル基を持つモノマーを構成成分とするポリマーを表面に担持した固相担体を脱水剤により環状の酸無水物とし、ついで、末端部にアミノ基を有するDNA断片を含有する水性液体を点着することを特徴とするDNA断片の固相担体表面への固定方法、この方法により得られたDNAチップ、そしてそのDNAチップを用いるDNAチップ上のDNA断片に対して相補性を有する核酸断片を検出する方法。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 環状の酸無水物構造を有するポリマーを表面に担持した固相担体上に、末端部にアミノ基を有するDNA断片を含有する水性液体を点着すること特徴とするDNA断片の固相担体表面への固定方法。

【請求項2】 環状の酸無水物構造を有するポリマーが無水マレイン酸を重合成分として得られたものであることを特徴とする請求項1に記載のDNA断片の固相担体表面への固定方法。

【請求項3】 カルボキシル基を有するモノマーを構成成分とするポリマーを表面に担持した固相担体を脱水剤により環状の酸無水物とし、ついで、末端部にアミノ基を有するDNA断片を含有する水性液体を点着すること特徴とするDNA断片の固相担体表面への固定方法。

【請求項4】 水性液体の点着後、80乃至180℃の範囲で加熱を行なうことを特徴する請求項1乃至3に記載のDNA断片の固相担体表面への固定方法。

【請求項5】 請求項1乃至4のうちのいずれかの項に記載の方法によって得られたDNAチップ。

【請求項6】 請求項5に記載のDNAチップの表面に、蛍光物質もしくは放射性物質で標識した核酸断片試料を含む水性液を付与する工程、DNAチップに固定されているDNA断片と相補性を有する核酸断片試料をハイブリダイゼーションによってDNAチップ上に固定する工程、そしてDNAチップ上に固定された標識核酸断片試料の蛍光標識もしくは放射性標識を検出する工程からなる、DNAチップ上のDNA断片に対して相補性を有する核酸断片の検出方法。

【請求項7】 請求項5に記載のDNAチップの表面に、導電性基を有するインターカレータと核酸断片試料を含む水性液を付与する工程、DNAチップに固定されているDNA断片と相補性を有する核酸断片試料をハイブリダイゼーションによってDNAチップ上に固定する工程、そしてDNAチップのDNA断片と核酸断片試料とから形成されたハイブリッド構造内に取り込まれたインターカレータの導電性基を介して流れる電流を電気化学的に検出する工程からなる、DNAチップ上のDNA断片に対して相補性を有する核酸断片の検出方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、遺伝子の発現、変異、多型等の同時解析に非常に有用である、多数のDNA断片やオリゴヌクレオチドを固相表面に整列させた高密度アレイ（DNAチップ）の作製に必要な、DNA断片の固相担体表面への固定方法に関する。本発明はまた、そのDNA断片の固相担体表面への固定方法により製造されたDNAチップ、そしてDNAチップ上のDNA断片に対して相補性を有する核酸断片の検出方法にも関する。

## 【0002】

【従来の技術】 多彩な生物の全遺伝子機能を効率的に解析するための技術開発が進んでおり、その解析手段として、DNAチップが利用されている。DNAチップは通常、スライドガラス等の固相担体に多数のDNA断片を整列固定させたマイクロアレイの形態にあり、DNAチップに固定されているDNA断片と相補性を持つDNA断片試料をハイブリダイゼーションによってDNAチップ上に固定し、検出する方法に利用される。形成されたハイブリッドの検出手段としては、DNA断片試料に予め結合させた蛍光標識あるいは放射性標識を利用する方法、そしてハイブリッドに取り込まれる導電性基を持つインターカレータを利用する方法などが知られている。

【0003】 DNAチップを用いるDNAチップ技術は、DNA以外の生体分子にも適用可能であり、創薬研究、疾病の診断や予防法の開発、エネルギーや環境問題対策等の研究開発に新しい手段を提供するものとして期待されている。

【0004】 DNAの解析手段としてのDNAチップの利用が具体化してきたのは、DNAの塩基配列をオリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションによって決定する方法（SBH, sequencing by hybridization）が考案されたことに始まる（Dermanac, R. et al., Genomics, 4, page 114 (1989)）。SBHは、ゲル電気泳動を用いる塩基配列決定法の限界を克服できる方法ではあったが、実用化には至らなかった。

【0005】 その後、DNAチップ作製技術が開発され、遺伝子の発現、変異、多型等を短時間で効率よく調べる、いわゆるHTS (high throughput screening) が可能となった（Fodor, S. P. A., Science, 251, page 767 (1991) および Schena, M., Science, 270, page 467 (1995)）。

【0006】 しかし、DNAチップ利用技術を実用化するためには、多数のDNA断片やオリゴヌクレオチドを固相担体表面に整列固定させるためのDNAチップの作製技術が必要とされる。

【0007】 DNAチップの作製方法としては、固相担体表面で直接DNA断片を合成する方法（「オン・チップ法」という。）と、予め別に調製したDNA断片を固相担体表面に固定する方法とが知られている。オン・チップ法としては、光照射で選択的に除去される保護基の使用と、半導体製造に利用されるフォトリソグラフィー技術および固相合成技術とを組み合わせ、微小なマトリックスの所定の領域での選択的合成を行う方法（「マスキング技術」という。）が代表的である。

【0008】 予め調製したDNA断片を固相担体表面に固定する方法としては、DNA断片の種類や固相担体の種類に応じて下記の方法がある。

(1) 固定するDNA断片がcDNA (mRNAを鋳型にして合成した相補的DNA) やPCR産物 (cDNAをPCR法によって増幅させたDNA断片) の場合には、これらをDNAチップ作製装置に備えられたスポット装置を用いて、ポリ陽イオン (ポリリシン、ポリエチレンジアミン等) で表面処理した固相担体表面に点着して、DNAの荷電を利用して固相担体に静電結合させる方法が一般的に利用される。また、固相担体表面の処理方法として、アミノ基、アルデヒド基、エポキシ基等を有するシランカップリング剤を用いる方法も利用されている (Geo, Z. et al., *Nucleic Acid Research*, 22, 5456-5465 (1994))。この場合には、アミノ基、アルデヒド基等は、共有結合により固相担体表面に導入されるため、ポリ陽イオンによる場合と比較して安定に固相担体表面に存在する。

【0009】DNAの荷電を利用する方法の変法として、アミノ基で修飾したPCR産物をSSC (標準食塩クエン酸緩衝液) に懸濁させ、これをシリル化したスライドガラス表面に点着し、インキュベートした後、水素化ホウ素ナトリウムによる処理および加熱処理を順に行う方法が報告されている (Schena, M. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 10614-10619 (1996))。しかし、この固定方法では必ずしも十分な安定度が得られ難いという問題がある。DNAチップ技術では、検出限界が重要となる。そのため、固相担体表面に十分な量で安定にDNA断片を固定する技術の開発は、固定DNA断片と標識した試料核酸断片とのハイブリダイゼーションの検出限界の向上に大きく寄与する。

【0010】(2) 固定するDNA断片が合成オリゴヌクレオチドの場合には、反応活性基を導入したオリゴヌクレオチドを合成し、表面処理した固相担体表面に該オリゴヌクレオチドを点着し、共有結合させる (「蛋白質・核酸・酵素」、43巻、(1998)、2004-2011; Lamture, J. B. et al., *Nucl. Acids Res.*, 22, 2121-2125, 1994、およびGuo, Z., et al., *Nucl. Acids Res.*, 22, 5456-5465, 1994)。例えば、アミノ基を導入したスライドガラスに、PDC (p-フェニレンジイソチオシアネート) 存在下、アミノ基導入オリゴヌクレオチドを反応させる方法、および該スライドガラスに、アルデヒド基導入オリゴヌクレオチドを反応させる方法が知られている。これらの二つの方法は、前記(1)のDNAの荷電を利用する方法と比べて、オリゴヌクレオチドが固相担体表面に安定に固定される。しかし、PDCを存在させる方法は、PDCとアミノ基導入オリゴヌクレオチドとの反応が遅く、またアルデヒド基導入オリゴヌクレオチドを用いる方法は、反応生成物であるシッフ塩基の安

定性が低い (通常、加水分解が起こり易い) という問題点を有し、さらに、固相表面にアミノ基のようにDNAとの相互作用の強い官能基が全面に存在すると、被検体である核酸断片がDNAチップ全面に非特異的に付着しやすいため、検出を妨害するという問題がある。このため、これを防止するために、未反応の官能基を塞ぐ、ブロッキングという工程が必要であった。

【0011】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、固相担体表面に、予め別に調製したDNA断片を迅速な反応によって結合させることが可能で、かつ、反応生成物が安定に結合を維持することが可能な固定方法、ブロッキング工程を特に必要としないDNAチップ、および核酸断片の検出方法を提供することを、その課題とする。

【0012】

【課題を解決するための手段】上記の課題は下記の本発明によって解決された。

(1) 環状の酸無水物構造を有するポリマーを表面に担持した固相担体上に、末端部にアミノ基を有するDNA断片を含有する水性液体を点着することと特徴とするDNA断片の固相担体表面への固定方法。この固定方法では、環状の酸無水物構造を有するポリマーが無水マレイン酸を重合成分として得られたものであることが好ましい。また、水性液体の点着後、80乃至180℃の範囲で加熱を行なうことが好ましい。

(2) カルボキシル基を有するモノマーを構成成分とするポリマーを表面に担持した固相担体を脱水剤により環状の酸無水物とし、ついで、末端部にアミノ基を有するDNA断片を含有する水性液体を点着することと特徴とするDNA断片の固相担体表面への固定方法。この固定方法でも、水性液体の点着後、80乃至180℃の範囲で加熱を行なうことが好ましい。

【0013】(3) 上記の方法によって得られたDNAチップ。

【0014】(4) 上記のDNAチップの表面に、蛍光物質もしくは放射性物質で標識した核酸断片試料を含む水性液を付与する工程、DNAチップに固定されているDNA断片と相補性を有する核酸断片試料をハイブリダイゼーションによってDNAチップ上に固定する工程、そしてDNAチップ上に固定された標識核酸断片試料の蛍光標識もしくは放射性標識を検出する工程からなる、DNAチップ上のDNA断片に対して相補性を有する核酸断片の検出方法。

(5) 上記のDNAチップの表面に、導電性基を有するインターカレータと核酸断片試料とを含む水性液を付与する工程、DNAチップに固定されているDNA断片と相補性を有する核酸断片試料をハイブリダイゼーションによってDNAチップ上に固定する工程、そしてDNAチップのDNA断片と核酸断片試料とから形成されたハイブリッド構造内に取り込まれたインターカレータの導

電性基を介して流れる電流を電気化学的に検出する工程からなる、DNAチップ上のDNA断片に対して相補性を有する核酸断片の検出方法。

【0015】本発明は、被検体の核酸断片試料との相互作用が小さく、かつアミノ基との反応性を有する固相担体を用い、そして、アミノ基を末端に有するDNA断片を作成し、固相担体上に点着した箇所でのみ、該DNA断片と固相担体との間に強固な共有結合が形成され、固定化が起こる。被検体核酸断片試料との相互作用の小さい固相担体を用いている結果として、ブロッキング工程が不要となることに基づいている。

【0016】さらに詳しく述べると、本発明においては、固相担体表面へのDNA断片固定は共有結合の形成をもって行われる。この共有結合の形成は固相担体表面に環状構造を有する酸無水物を固定し、この酸無水物とアミノ基を有するDNA断片間で形成される。一般に、アミノ基は酸無水物との反応が極めて高いために、水が存在しても大きく反応が阻害されることなく結合を形成する。一方、被検体となる核酸断片は水が存在する系においては、酸無水物との反応が遅く、実質的に反応しない。従って、固相担体上に固定されるべきDNA断片の末端にアミノ基を含有せしめ、これを含む水性液体を該固相担体上に点着して、共有結合を形成させることができ、一方、非点着部分では被検体の核酸断片が酸無水物とは反応しないため、ハイブリダイゼーションの起こった箇所でのみ被検体核酸断片が結合する。ハイブリダイゼーション工程の後に洗浄操作を行うことにより、非点着部分における非特異的な結合(吸着)を極めて小さいレベルに抑制することができる。この結果、ブロッキング工程が不要となる。本発明は以上の発見に基づいている。

【0017】本発明のDNA断片の固相担体表面への固定方法の好ましい態様は、以下の通りである。

- (1) 固相担体表面に環状の酸無水物構造を有するポリマーを結合させる。
- (2) DNA断片として、末端にアミノ基を有し、その塩基配列が既知であるものを用いる。
- (3) (1)で作製した固相担体表面に、(2)で示した末端にアミノ基を有するDNA断片を含む液体を点着する。点着部分においてはアミノ基を有するDNA断片が共有結合により固定される。

【0018】

【発明の実施の形態】本発明のDNA断片固定固相担体(以下「DNAチップ」という。)では、固相担体表面に固定された環状の酸無水物構造を有する化合物に、共有結合を介してDNA断片が固定されている。DNA断片の固相担体表面への固定は、固相担体表面に、環状の酸無水物構造を有する化合物を固定する工程、そしてアミノ基を末端に含有したDNA断片を含む液体を点着し、点着部分での酸無水物とアミノ基間の反応によって

DNA断片を固定する工程を順次行うことによってなされる。

【0019】本発明の代表的な固定方法を下記に示す。環状の酸無水物構造を有するポリマーを固相担体表面に担持してなる固相担体に、末端にアミノ基を有するDNA断片を含む液体を点着する。点着部分においては酸無水物部分とアミノ基を有するDNA断片が共有結合を形成する。このように、DNA断片を固定する工程を順次行うことによってDNAチップを得ることができる。DNA断片が有するアミノ基と、DNA断片のリン酸エステル基との間には、合成の都合上、クロスリンカーを存在させてもよい。以下、各工程について説明する。

【0020】本発明で用いる固相担体は、疎水性、あるいは親水性の低い担体であることが好ましい。また、その表面が凹凸を有する平面性の低いものであっても好ましく用いることができる。固相担体の材質としては、ガラス、セメント、陶磁器等のセラミックスもしくはニューセラミックス、ポリエチレンテフタレート、酢酸セルロース、ビスフェノールAのポリカーボネート、ポリスチレン、ポリメチルメタクリレート等のポリマー、シリコン、活性炭、多孔質ガラス、多孔質セラミックス、多孔質シリコン、多孔質活性炭、織物、編み物、不織布、濾紙、短繊維、メンブレンフィルター等の多孔質物質、金などの導電性材料などを挙げることができる。多孔質物質の細孔の大きさは、2乃至1000nmの範囲にあることが好ましく、2乃至500nmの範囲にあることが特に好ましい。固相担体の材質は、ガラスもしくはシリコンであることが特に好ましい。これは、表面処理の容易さや電気化学的方法による解析の容易さによるものである。固相担体の厚さは、100乃至2000μmの範囲にあることが好ましい。

【0021】本発明で用いられる環状の酸無水物構造を有するポリマーについて述べる。環状の酸無水物構造としては、4乃至20員環を形成していることが好ましく、5乃至12員環がより好ましく、5乃至7員環がさらに好ましい。この環状の酸無水物構造を有するポリマーは次に述べる二つの方法によって得ることができる。

一つは予め環状の酸無水物構造を有するモノマーを単独であるいは他の重合性成分と共重合することによって得ることができる。環状の酸無水物構造を有するモノマーとしては、無水マレイン酸、デヒドロ無水グルタル酸、無水イタコン酸の2重結合をそのまま重合性基として用いる方法であり、例えば特開平7-110577号に記載のポリマーである。この他、無水マレイン酸、デヒドロ無水グルタル酸、無水グルタル酸、無水フタル酸、無水ヒドロフタル酸、無水コハク酸、無水ホモフタル酸、無水イサト酸、無水ナフタル酸、無水イミノジ酢酸、無水ジグリコール酸、無水ジフェン酸、無水キノリン酸、無水2,3-ヒラジンジカルボン酸、無水3,4-ヒラジンジカルボン酸、無水2-スルホ安息香酸などの環状



無水物に対して、アクリル酸アミド、アクリル酸エステル、メタクリル酸アミド、メタクリル酸エステル、スチレン、末端アルキレン、末端アルキンなどの重合性基を結合する方法であり、例えば、特開平8-123026号に記載のポリマーにおいて、ハーフアミド構造が酸無水物構造になったものがこの例として挙げられる。

【0022】もう一つの方法としては、カルボキシ基を有するモノマーを単独であるいは他の重合性成分と共重合し、固相担体表面に担持した後、脱水剤を作用させて環状の酸無水物を形成する方法である。この方法は環状の酸無水物構造の導入密度が上記の方法に比して劣る場合が多いが、固相担体表面に担持する際に水やアルコールなどの求核性基が共存しても良く、固相担体表面への薄膜形成の面で自由度が大きい点で有利である。カルボキシ基を有するモノマーの例としてはアクリル酸、メタクリル酸、2-カルボキシエチルアクリレート、 fumaric acid、maleic acid、vinyl pyruvic acid、itaconic acid、maleic anhydride、cyclohexanone (2-acryloyloxyethyl ester)、cyclohexanone (2-methacryloyloxyethyl ester) およびこれらの塩が挙げられる。この他にマレイン酸、デヒドログルタル酸、グルタル酸、フタル酸、ヒドロフタル酸、コハク酸、ホモフタル酸、ナフタル酸、イミノジ酢酸、ジグリコール酸、ジフェン酸、キノリン酸、2,3-ピラジンジカルボン酸、3,4-ピラジンジカルボン酸、2-スルホ安息香酸などに対して、アクリル酸アミド、アクリル酸エステル、メタクリル酸アミド、メタクリル酸エステル、スチレン、末端アルキレン、末端アルキンなどの重合性基を結合したものを用い、固相担体表面に担持した後、脱水剤を作用させて環状の酸無水物を形成する方法も好ましく用いることができる。

【0023】上記の方法で用いられる脱水剤としては、酸無水物を生成する試薬として公知のものはいずれも使用できるが、好ましくは酸無水物（無水酢酸、無水フイブロン酸など）、酸ハロゲン化物（メタンスルホンクロリド、クロロ炭酸イソブチルなど）、カルボジイミド類（ジシクロヘキシルカルボジイミド、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩など）、2-ハロピリジニウム化合物（ヨウ化 2-フルオロ-1-メチルピリジニウムなど）、2位に離脱基を有する1,1,3,3-テトラアルキルアジニウム化合物（O-（ベンゾトリアゾール-1-イル）N,N,N',N'-テトラメチルウレニウムヘキサフルオロリン酸塩、塩化2-エチル-1,3-ジメチルイミダゾリニウムなど）、活性エステルおよび活性アミド類（酢酸1-スクシンイミジル、カルボニルジイミダゾールなど）などが好ましく用いられる。

【0024】本発明において、環状の酸無水物構造を有するポリマーはモノマー単位として10乃至100%の範囲の酸無水物構造を有していることが好ましく、20

乃至95%の範囲の酸無水物構造を有していることが特に好ましい。

【0025】本発明で用いられる環状の酸無水物構造を有するポリマーは、固相担体と該ポリマーの密着性を向上させる目的で、密着性改良用の共重合モノマーを使用することができる。密着性改良用の共重合モノマーの例としてはシランカップリング剤を好ましく用いることができる。この具体例としては、ジエトキシメチルビニルシラン、ジメチルエトキシビニルシラン、メタクリル酸-3-トリメトキシシリルプロピルエステル、トリアセトキシビニルシラン、アクリル酸-3-トリメトキシシリルプロピルエステル、トリアセトキシビニルシラン、トリエトキシビニルシラン、3-(トリメチルシリルオキシ)シリル)プロピルメタクリレート、3-(トリメチルシリルオキシ)シリル)プロピルアクリレート、トリメトキシビニルシラン、トリメチル(2-メトキシエトキシ)ビニルシランなどが挙げられる。これらのモノマーは、ポリマー全体の0.05乃至20質量%の範囲にあることが好ましく、0.1乃至10質量%の範囲にあることが特に好ましく、0.3乃至5質量%の範囲にあることが特に好ましい。

【0026】本発明で用いられる環状の酸無水物構造を有するポリマーにおいて共重合モノマーとして好ましく用いられる例としては、(メタ)アクリル酸エステル類、(メタ)アクリルアミド類、アリル化合物、ビニルエチル類、ビニルエスエル類、スチレン類、クロトン酸エステル類などから選ばれるものが挙げられる。具体的には、例えば、(メタ)アクリル酸エステル類、例えば、アルキル(メタ)アクリレート、又は置換(メタ)アルキルアクリレート（例えば、メチル(メタ)アクリレート、エチル(メタ)アクリレート、プロピル(メタ)アクリレート、イソプロピル(メタ)アクリレート、ブチル(メタ)アクリレート、アミル(メタ)アクリレート、ヘキシル(メタ)アクリレート、シクロヘキシル(メタ)アクリレート、エチルヘキシル(メタ)アクリレート、オクチル(メタ)アクリレート、n-オクチル(メタ)アクリレート、クロロエチル(メタ)アクリレート、アリル(メタ)アクリレート、2-ヒドロキシエチル(メタ)アクリレート、2-ヒドロキシプロピル(メタ)アクリレート、4-ヒドロキシブチル(メタ)アクリレート、2-ジメチル-3-ヒドロキシプロピル(メタ)アクリレート、5-ヒドロキシペンチル(メタ)アクリレート、トリメチルフルフルバンモノ(メタ)アクリレート、ペンタエリスリトールモノ(メタ)アクリレート、ベンジル(メタ)アクリレート、メトキシベンジル(メタ)アクリレート、クロロベンジル(メタ)アクリレート、フルフルル(メタ)アクリレート、テトラヒドロフルフルル(メタ)アクリレート、フェノキシエチル(メタ)アクリレートなど；アリル(メタ)アクリレート（例えば、フェニル(メタ)アク

リレート、クレジル(メタ)アクリレート、ナフチル(メタ)アクリレートなど)；(メタ)アクリルアミド類、例えば、(メタ)アクリルアミド、*N*-アルキル(メタ)アクリルアミド(該アルキル基としては、例えば、メチル基、エチル基、プロピル基、ブチル基、ヘプチル基、オクチル基、エチルヘキシル基、シクロヘキシル基、ヒドロキシエチル基、ベンジル基などがある。)、*N*-アリール(メタ)アクリルアミド(該アリール基としては、例えば、フェニル基、トリル基、ニトロフェニル基、ナフチル基、ヒドロキシフェニル基などがある。)、*N,N*-ジアルキル(メタ)アクリルアミド(該アルキル基としては、例えば、メチル基、エチル基、ブチル基、イソブチル基、エチルヘキシル基、シクロヘキシル基などがある。)、*N,N*-ジアリール(メタ)アクリルアミド(該アリール基としては、例えば、フェニル基などがある。)、*N*-メチル-*N*-フェニル(メタ)アクリルアミド、*N*-ヒドロキシエチル-*N*-メチル(メタ)アクリルアミド、*N*-アセトアミドエチル-*N*-アセチル(メタ)アクリルアミド、*N*-(フェニルスルホニル)(メタ)アクリルアミド、*N*-(*p*-メチルフェニルスルホニル)(メタ)アクリルアミドなど；アリル化合物、例えば、アリルエステル類(例えば、酢酸アリル、カプリン酸アリル、カプリル酸アリル、ラウリン酸アリル、パルミチン酸アリル、ステアリン酸アリル、安息香酸アリル、アセト酢酸アリル、乳酸アリルなど)、アリルオキシエタノールなど；ビニルエーテル類、例えば、アルキルビニルエーテル(該アルキル基としては例えば、ヘキシル基、オクチル基、デシル基、エチルヘキシル基、メトキシエチル基、エトキシエチル基、クロルエチル基、1-メチル-2,2-ジメチルプロピル基、2-エチルブチル基、ヒドロキシエチル基、ヒドロキシエトキシエチル基、ジメチルアミノエチル基、ジエチルアミノエチル基、ブチルアミノエチル基、ベンジル基、テトラヒドロフルフリル基などがある)、ビニルアリルエーテル(該アリール基としては例えば、フェニル基、トリル基、クロロフェニル基、2,4-ジクロロフェニル基、ナフチル基、アントラニル基などがある)；ビニルエステル類、例えば、ビニルブチレート、ビニルイソブチレート、ビニルトリメチルアセテート、ビニルジエチルアセテート、ビニルバレート、ビニルカフエート、ビニルクロルアセテート、ビニルジクロロアセテート、ビニルメトキシアセテート、ビニルブトキシアセテート、ビニルフェニルアセテート、ビニルアセトアセテート、ビニルラクテート、ビニル- $\beta$ -フェニルブチレート、ビニルシクロヘキシルカルボキシレート、安息香酸ビニル、サリチル酸ビニル、クロロ安息香酸ビニル、テトラクロロ安息香酸ビニル、ナフトエ酸ビニルなど；スチレン類、例えば、スチレン、アルキルスチレン(例えば、メチルスチレン、ジメチルスチレン、トリメチルスチレン、エチルスチレン、ジエチルスチレン、イソプロピルスチレン、ブチルスチレン、ヘキシルスチレン、シクロヘキシルスチレン、デシルスチレン、ベンジルスチレン、クロロメチルスチレン、トリフルオロメチルスチレン、エトキシメチルスチレン、アセトキシメチルスチレンなど)、アルコキシスチレン(例えば、メトキシスチレン、4-メトキシ-3-メチルスチレン、ジメトキシスチレンなど)、ハロゲノスチレン(例えば、クロロスチレン、ジクロロスチレン、トリクロロスチレン、テトラクロロスチレン、ペンタクロロスチレン、ブromoスチレン、ジブromoスチレン、ヨードスチレン、フルオロスチレン、トリフルオロスチレン、2-ブromo-4-トリフルオロメチルスチレン、4-フルオロ-3-トリフルオロメチルスチレンなど)；クロトン酸エステル類、例えば、クロトン酸アルキル(例えば、クロトン酸ブチル、クロトン酸ヘキシル、グリセリンモノクロトンネートなど)；イタコン酸ジアルキル類(例えば、イタコン酸ジメチル、イタコン酸ジエチル、イタコン酸ジブチルなど)；マレイン酸あるいはフマル酸のジアルキル類(例えば、ジメチルマレエート、ジブチルマレエートなど)；(メタ)アクリロニトリル等がある。

【0027】本発明において用いられる環状の酸無水物構造を有するポリマーの重量平均分子量は、500乃至100000の範囲にあることが好ましく、700乃至50000の範囲にあることがより好ましく、800乃至20000の範囲にあることが特に好ましい。重量平均分子量が500未満のポリマーは、DNA断片の固定性に欠けるため、好ましくない。

【0028】環状の酸無水物構造を有するポリマーが固定された固相担体は、次のようにして作製することができる。ガラス製の担体場合には、ポリマーの共重合成分として導入された前述のシランカップリング剤を接触、反応させて固相表面上に環状の酸無水物構造を有するポリマーが担持された固相担体を得ることができる。

【0029】表面にアミノ基を有する固相担体(例えば、ガラス製担体表面を3-アミノプロピルトリメトキシシランを作用させて作製する)を用いる場合には、予め環状の酸無水物構造が導入されたポリマーにおいては、該アミノ基に直接接触させる形で固定化することができる。また、環状の酸無水物構造を有していない、カルボキシル基を有するポリマーの場合には、該カルボキシル基を有するポリマーの溶液を担体上に付与した後、適当な縮合剤を作用させて、アミド結合を形成させることにより、固定することができる。この際に、縮合剤としては、前述の酸無水物を固相担体上で形成する時に用いられる脱水剤を使用することができる。従って、この方法の場合には担体上へのポリマーの固定と酸無水物の形成を同時に行うこともできる。

【0030】担体として、脂肪族水酸基を有する重合性モノマーを構成単位として有するポリマーを担持した固

担体も好ましく用いることができる。この場合、脂肪酸水酸基を有する重合性モノマーとしては3-ヒドロキシプロピルアクリレート、4-ヒドロキシブチルアクリレート、2-ヒドロキシエチルメタクリレートなどが挙げられ、これらの重合性モノマーはホモポリマーとして用いることもできるが、適宜、他の重合性モノマーと共重合して用いることも好ましい。これらのポリマーは、ラテックスとして担体表面に塗布した後、加熱処理などによって融着させる方法もとることができる。

【0031】上で述べた脂肪酸水酸基を有する化合物を固相担体に確実に固定する方法として、固定化剤を用いることができる。このような固定化剤としてはシランカップリング剤、多官能エポキシ化合物、多官能ビニルスルホン、塩化シアメルなどの多点反応剤が好ましく用いられる。この中ではシランカップリング剤が好ましく、シランカップリング剤の例としては1, 2-ビス(トリメトキシシリル)エタン、1, 7-ジ(1, 1, 1-トリメトキシシリル)ヘプタン、1, 3-ジ(1, 1, 1-トリメトキシシリル)プロパン、3-グリシジルオキシプロピルトリメトキシシランなどが挙げられる。また、シランカップリング剤を構成モノマーとして有するポリマーを用いることもできる。脂肪酸水酸基を有する化合物を固定する担体上には、層間の密着を良くするために、ゼラチンなどの下塗り層を施してもよいし、コロナ放電などにより、担体表面を処理する方法も用いることができる。

【0032】本発明の環状の酸無水物構造を有するポリマーを固相担体に固定する工程中およびDNA断片を点着後までの工程においては、酸、塩基や触媒の使用、水および有機溶媒の使用、加熱なども適宜行うことができる。酸としては無機酸および有機酸のいずれでも用いることができるが、塩酸、トリフルオロ酢酸、酢酸、硫酸、p-トルエンスルホン酸などが好ましく、トリフルオロ酢酸、酢酸が好ましい。

【0033】塩基としては、無機塩基および有機塩基の何れも用いることができるが、1-メチル-2-ピロリドン、トリエチルアミン、ピリジン、炭酸カリウムあるいは炭酸ナトリウムを用いることがより好ましく、1-メチル-2-ピロリドン、トリエチルアミンあるいはピリジンを用いることがさらに好ましく、1-メチル-2-ピロリドンを用いることが特に好ましい。加熱する場合には、その温度は40乃至150℃の範囲にあることが好ましく、50乃至120℃の範囲にあることが特に好ましい。

【0034】表面処理がされた固相担体表面上には、さらに、電荷を有する親水性高分子等からなる層や架橋剤からなる層を設けてもよい。このような層を設けることによって表面処理がされた固相担体の凹凸を軽減することができる。固相担体の種類によっては、その担体中に親水性高分子等を含ませることも可能であり、このよ

うな処理を施した固相担体も好ましく用いることができる。

【0035】クロスリンカーは、単結合、アルキレン基あるいはN-アルキルアミノアルキレン基であることが好ましく、単結合、ヘキシレン基あるいはN-メチルアミノヘキシレン基であることが特に好ましい。

【0036】DNA断片は、目的によって二通りに分けることができる。遺伝子の発現を調べるためには、cDNA、cDNAの一部、EST等のポリヌクレオチドを使用することが好ましい。これらのポリヌクレオチドは、その機能が未知であってもよいが、一般的にはデータベースに登録された配列を基にしてcDNAのライブラリー、ゲノムのライブラリーあるいは全ゲノムをテンプレートとしてPCR法によって増幅して調製する(以下、「PCR産物」という)。PCR法によって増幅しないものも好ましく使用することができる。また、遺伝子の変異や多型を調べるには、標準となる既知の配列をもとにして、変異や多型に対応する種々のオリゴヌクレオチドを合成し、これを使用することが好ましい。さらに、塩基配列分析の場合には、4<sup>n</sup>(nは、塩基の長さ)種のオリゴヌクレオチドを合成したものを使用することが好ましい。DNA断片の塩基配列は、一般的な塩基配列決定法によって予めその配列が決定されていることが好ましい。DNA断片は、2乃至50量体であることが好ましく、10乃至25量体であることが特に好ましい。

【0037】DNA断片の点着は、DNA断片を水性媒体に溶解あるいは分散した水性液を、96穴もしくは384穴プラスチックプレートに分注し、分注した水性液をスポッター装置等を用いて固相担体表面上に滴下して行うことが好ましい。

【0038】点着後のDNA断片の乾燥を防ぐために、DNA断片が溶解あるいは分散してなる水性液中に、高沸点の物質を添加してもよい。高沸点の物質としては、DNA断片が溶解あるいは分散してなる水性液に溶解し得るものであって、試料核酸断片とのハイブリダイゼーションを妨げることがなく、かつ粘性の大きくない物質であることが好ましい。このような物質としては、グリセリン、エチレングリコール、ジメチルスルホキシドおよび低分子の親水性ポリマーを挙げることができる。親水性ポリマーとしては、ポリアクリルアミド、ポリエチレングリコール、ポリアクリル酸ナトリウム等を挙げることができる。ポリマーの分子量は10<sup>3</sup>乃至10<sup>6</sup>の範囲にあることが好ましい。高沸点の物質としては、グリセリンあるいはエチレングリコールを用いることがさらに好ましく、グリセリンを用いることが特に好ましい。高沸点の物質の濃度は、DNA断片の水性液中、0.1乃至2容量%の範囲にあることが好ましく、0.5乃至1容量%の範囲にあることが特に好ましい。また、同じ目的のために、DNA断片を点着した後の固相担体を、

90%以上の湿度および25乃至50℃の温度範囲の環境に置くことも好ましい。

【0039】DNA断片を点着後、紫外線、水素化ホウ素ナトリウムあるいはシッフ試薬による後処理を施してもよい。これらの後処理は、複数の種類を組み合わせることもよく、加熱処理と紫外線処理を組み合わせることも特に好ましい。点着後は、インキュベーションを行うことも好ましい。インキュベート後、未点着のDNA断片を洗浄して除去することが好ましい。

【0040】DNA断片の固定量は、固相担体表面に対して、10<sup>1</sup>乃至10<sup>14</sup>種類・cm<sup>2</sup>の範囲にあることが好ましい。DNA断片の量は、1乃至10<sup>14</sup>モルの範囲にあり、重量としては数mg以下であることが好ましい。点着によって、DNA断片の水性液は、固相担体表面にドットの形状で固定される。ドットの形状は、ほとんど円形である。形状に変動がないことは、遺伝子発現の定量的解析や一塩基変異を解析するために重要である。ドット間の距離は、0乃至1.5mmの範囲にあることが好ましく、100乃至300μmの範囲にあることが特に好ましい。1つのドットの大きさは、直径が50乃至300μmの範囲にあることが好ましい。点着する量は、100pL乃至1μLの範囲にあることが好ましく、1乃至100nLの範囲にあることが特に好ましい。

【0041】環状の酸無水物構造を有するポリマーが導入された固相担体に、アミノ基を有するDNA断片を点着させると、該DNA断片が共有結合によって固相担体表面に固定されるが、固相担体の表面には該DNA断片が結合していない該ポリマーも存在する。このような該ポリマーの酸無水物構造は、標識された核酸断片試料とのハイブリダイゼーションにおいて非特異的な反応を生じる可能性があるため、予め、その該酸無水物構造をブロッキング処理（ブロッキング処理を施さなくても、本発明の固定方法によって製造された、DNA断片固定固相担体は、十分にDNAチップとして使用することができる。）しておくことも好ましい。ブロッキング処理に使用されるブロッキング試料としては、アンモニア、エタノールアミン、タウリン、アミノ酸類、エチルアミン等を挙げることができる。

【0042】上記の工程によって作製されたDNAチップの寿命は、cDNAが固定されてなるcDNAチップで数週間、オリゴDNAが固定されてなるオリゴDNAチップではさらに長期間である。これらのDNAチップは、遺伝子発現のモニタリング、塩基配列の決定、変異解析、多型解析等に利用される。検出原理は、後述する標識した試料核酸断片とのハイブリダイゼーションである。

【0043】標識方法としては、大別してRI法と非RI法（蛍光法、ビオチン法、電気化学的方法、化学発光法等）とが知られているが、本発明のDNAチップは、

蛍光法を用いる際に特に有利である。蛍光物質としては、核酸の塩基部分と結合できるものであれば何れも用いることができるが、たとえば、シアニン色素（例えば、CyDye<sup>TM</sup>シリーズのCy3、Cy5等）、7-メチル-6-ジメチル-2-ナフチル-1-アセトキシ-N<sup>3</sup>-アセチルアミノフルオレン（AAF）あるいはAAIF（AAFのヨウ素誘導体）を使用することができる。

【0044】なお、上記の標識を利用する以外にも、導電性基を持ち、形成されたハイブリッド構造体に取り込まれる性質を持つインターカレータを用いる電気化学的な検出方法を利用する方法も知られており、本発明のDNAチップは電気化学的な検出方法に利用することもできる。

【0045】試料として用いる核酸断片としては、その配列や機能が未知であるDNA断片試料あるいはRNA断片試料を用いることが好ましい。試料核酸断片は、遺伝子発現を調べる目的では、真核生物の細胞や組織サンプルから単離することが好ましい。試料がゲノムならば、赤血球を除く任意の組織サンプルから単離することが好ましい。赤血球を除く任意の組織は、末梢血液リンパ球、皮膚、毛髪、精液等であることが好ましい。試料がmRNAならば、mRNAが発現される組織サンプルから抽出することが好ましい。mRNAは、逆転写反応により標識dNTP（「dNTP」は、塩基がアデニン（A）、シトシン（C）、グアニン（G）もしくはチミン（T）であるデオキシリボヌクレオチドを意味する。）を取り込ませて標識cDNAとすることが好ましい。dNTPとしては、化学的な安定性のため、dCTPを用いることが好ましい。1回のハイブリダイゼーションに必要なmRNA量は、液量や標識方法によって異なるが、数μg以下であることが好ましい。尚、DNAチップ上のDNA断片がオリゴDNAである場合には、試料核酸断片は低分子化しておくことが望ましい。原核生物の細胞では、mRNAの選択的な抽出が困難なため、全RNAを標識することが好ましい。試料核酸断片は、遺伝子の変異や多型を調べる目的では、標識プライマーもしくは標識dNTPを含む反応系で標的領域のPCRを行って得ることが好ましい。

【0046】ハイブリダイゼーションは、96穴もしくは384穴プラスチックプレートに分注しておいた、標識した試料核酸断片が溶解あるいは分散してなる水性液を、上記で作製したDNAチップ上に点着することによって実施することが好ましい。点着の量は、1乃至100nLの範囲にあることが好ましい。ハイブリダイゼーションは、室温乃至70℃の温度範囲で、そして6乃至20時間の範囲で実施することが好ましい。ハイブリダイゼーション終了後、界面活性剤と緩衝液との混合溶液を用いて洗浄を行い、未反応の試料核酸断片を除去することが好ましい。界面活性剤としては、ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）を用いることが好ましい。緩衝液と

しては、クエン酸緩衝液、リン酸緩衝液、ホウ酸緩衝液、トリス緩衝液、グッド緩衝液等を用いることができるが、クエン酸緩衝液を用いることが特に好ましい。

【0017】DNAチップを用いるハイブリダイゼーションの特徴は、標識した試料核酸断片の使用量が非常に少ないことである。そのため、固相担体に固定するDNA断片の鎖長や標識した試料核酸断片の種類により、ハイブリダイゼーションの最適条件を設定する必要がある。遺伝子発現の解析には、低発現の遺伝子も十分に検出できるように、長時間のハイブリダイゼーションを行うことが好ましい。塩基変異の検出には、短時間のハイブリダイゼーションを行うことが好ましい。また、互いに異なる蛍光物質によって標識した試料核酸断片を二種類用意し、これらを同時にハイブリダイゼーションに用いることにより、同一のDNAチップ上で発現量の比較や定量ができる特徴もある。

【0018】

【実施例1】DNA断片固定スライドの作成及びDNA断片の固定量の測定

(1) 環状の酸無水物構造を有するポリマーが固定されたスライド(C)の作成常法にて合成したポリマー(スチレン：無水マレイン酸：3-（トリメトキシシリル）プロピルメタクリレート（東京化成工業（株）製）-6：5：30：5モル比）をプロピレングリコールモノメチルエーテルアセテート／メチルエチルケトン-4／1に溶解し、10質量%の溶液を作成した。この溶液に、スライドガラス（25mm×75mm）を10分間浸した後取り出し、アセトニトリルで洗浄後、110℃で10分間乾燥して、環状の酸無水物構造を有するポリマーが表面に固定されたスライド(C)を作成した。

【0019】(2) DNA断片の点着と蛍光強度の測定  
3'末端および5'末端がそれぞれアミノ基、蛍光標識試薬（FluoroLink-Cy5dCTP、アマシャム・ファルマシア・バイオテック社製）で修飾されたDNA断片（3'-CTAGTCTGTGAAGTGTCTGATC5'）を0.1M炭酸緩衝液（pH9.3）に分散してなる水性液（1×10<sup>-6</sup>M、1μL）に、3質量%になるようにジメチルスルホキシドを添加した溶液を作成し、上記(1)で得たスライド(C)にこれを点着した。直ちに、点着後のスライドを25℃、湿度90%にて1時間放置した後、このスライドを0.1質量% SDS（ドデシル硫酸ナトリウム）と2×SSC（2×SSC：SSCの原液を2倍に希釈した溶液、SSC：標準食塩クエン酸緩衝液）との混合溶液で2回、0.2×SSC水溶液で1回順次

洗浄した。次いで、上記の洗浄後のスライドを0.1Mグリシン水溶液（pH10）中に1時間30分浸漬した後、蒸留水で洗浄し、室温で乾燥したのち、100℃で15分間加熱し、DNA断片が固定されたスライド(D1)を得た。このスライド(D1)表面の蛍光強度を蛍光スキャニング装置で測定したところ、1530であった。本発明の固定化方法により、DNA断片が効率よくスライドガラスに固定されたことが分かる。

【0050】「実施例2」試料DNA断片の検出

(1) DNAチップの作成

3'末端が蛍光標識試薬で修飾されていないDNA断片を用いる以外は実施例1と同様にして、DNA断片が固定されたスライド(D2)を得た。

(2) 試料DNA断片の検出

5'末端にCy5が結合した22merの試料オリゴヌクレオチド（GATCAGACACTTCAGACTAG5'）をハイブリダイゼーション用溶液（4×SSCおよび10質量%のSDSの混合溶液）（20μL）に分散させたものを、上記(1)で得たスライド(D2)に点着し、表面を顕微鏡用カバーガラスで保護した後、モイスチャンバー内にて60℃で20時間インキュベートした。次いで、このものを0.1質量% SDSと2×SSCとの混合溶液、0.1質量% SDSと0.2×SSCとの混合溶液、および0.2×SSC水溶液で順次洗浄した後、600rpmで20秒間遠心し、室温で乾燥した。スライドガラス表面の蛍光強度を蛍光スキャニング装置で測定したところ、542であった。本発明の固定化方法によって作成されたDNAチップを用いることによって、DNAチップに固定されているDNA断片と相補性を有する試料DNA断片を検出できることが分かる。

【0051】

【発明の効果】本発明によって、固相担体表面にDNA断片を安定かつ迅速に固定することができる。特に、固相担体表面に環状の酸無水物構造を有するポリマーを有する場合には、DNA断片の結合が共有結合であるため、強固にDNA断片を固定することができる。DNA断片の安定な固定は、遺伝子解析等に有効に利用することができる高い検出限界を有するDNAチップの作製が可能となる。その一つの例として、本発明によって作製されたDNAチップを用いて、試料核酸断片とのハイブリダイゼーションを行うことにより、DNAチップに固定されているDNA断片に相補性を有する試料核酸断片を感度よく検出することができる。

フロントページの続き

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>

G 0 1 N 33/566

識別記号

F 1

C 1 2 N 15/00

特許名(参考)

Z N A Z

(72) 発明者 篠木 浩

埼玉県朝霞市泉永3-11-46 富士写真フ

イルム株式会社内

F ターム(参考) 4B033 NA45 NB04 NB13 NB15 NB25

NB34 NB36 NC03 ND05 ND08

4B063 QA01 QA18 QQ42 QR32 QR56

QR84 QS03 QS34 QS39 QX02